



ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GEN DE LA CELOBIOHIDROLASA II DE *Colletotrichum lindemuthianum*

Ma. Irene Morelos Martínez, María Guadalupe Zavala Páramo, Karla Morelia Díaz Tapia, Horacio Cano Camacho. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., C.P. 58100, E-mail: more_ire1@hotmail.com

Palabras clave: CBHII, *Colletotrichum lindemuthianum*, biotecnología.

Introducción. *Colletotrichum lindemuthianum* es el hongo patógeno causante de la antracnosis del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *C. lindemuthianum* secreta diferentes tipos de enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran las celobiohidrolasas (CBHs) (EC 3.2.1.91), enzimas celulolíticas (exo- β -1,4-glucanasas) que atacan extremos reductores (CBHI) y no reductores (CBHII) en el polímero de celulosa (1) (2). Las celulasas fúngicas tienen un gran potencial biotecnológico en varias industrias, entre las que se incluyen la industria cervecera, vinícola, agrícola, papelera, textil, de detergentes, alimentación animal y de biocombustibles (3).

Objetivo: Realizar el aislamiento y análisis bioinformático-molecular del ADN y ADNc del gen *cbhII* que codifica para una celobiohidrolasa II de las razas no patógena (0) y patógena (1472) de *C. lindemuthianum*.

Metodología. Se utilizaron las razas patógena (1472) y no patógena (0) del hongo filamentoso *C. lindemuthianum*. Se realizó extracción de ARN total por el método de TRIzol® y de ADN genómico por el método Kuramae-Izoaka (4). La amplificación por PCR del gen *cbhII* se realizó mediante juegos de oligonucleótidos específicos diseñados en este estudio. Los productos de amplificación del ADN y ADNc se secuenciaron por el método dideoxi y las secuencias se alinearon con el software Clustal X. Se hizo modelaje 3D mediante I-TASSER y la edición de estructuras mediante Swiss model PDV wiwer y Ras mol, con el templado de la CBHII cristalizada de *Trichoderma reesei* (5). También se construyó un árbol filogenético consenso con las secuencias de la CBHII del género *Colletotrichum* disponibles en base de datos NCBI por los métodos de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) usando los softwares Mega 6 y Mr. Bayes respectivamente.

Resultados. La secuencia del ADN genómico presentó un 100% de identidad con la secuencia de ADNc y fue 100% idéntica entre ambas razas del hongo. La comparación en base de datos (NCBI) de la secuencia deducida de la CBHII, mostró 99% de identidad y 99% de similitud con la proteína correspondiente de *Colletotrichum orbiculare*. La topología del modelo 3D obtenido coincidió con la topología de β -barril modificado característico de la familia 6 de las Glicosil hidrolasas (GH6). Además, la sobreposición de las proteínas de *C. lindemuthianum* y *T. reesei*, mostró alta similitud incluyendo la posición de los aminoácidos catalíticos (Fig. 1). El árbol filogenético mostró la presencia de tres clados o linajes principales. Dentro del clado con mayor número de secuencias, un subclado o linaje agrupó las CBHII de tres patotipos de *C. lindemuthianum* (0, 89 y 1472) y la de *C. orbiculare* (Fig. 2).

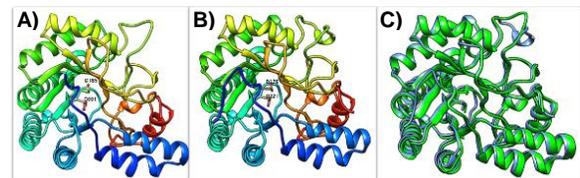


Fig. 1. Estructura 3D de la CBHII. **A)** Modelo diseñado para *C. lindemuthianum*, **B)** Estructura cristalizada en *T. reesei* pdb **C)** Sobreposición de ambas estructuras.

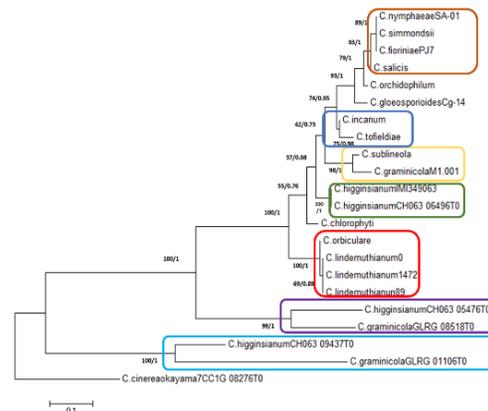


Fig. 2. Árbol filogenético consenso, el clado formado por los patotipos de *C. lindemuthianum* y la especie hermana *C. orbiculare* se muestra dentro del rectángulo rojo, con valores máximos de soporte por ambos métodos (ML e IB).

Conclusiones. El gen *cbhII* de *C. lindemuthianum* muestra alta identidad con el de *C. orbiculare*. El modelo 3D diseñado confirmó la pertenencia de la proteína CBHII a la familia GH6. El análisis filogenético reveló que la CBHII de *C. lindemuthianum* y la CBHII de *C. orbiculare* pertenecen a un linaje que no comparten otras enzimas del género.

Agradecimientos. A la Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH, por el apoyo del proyecto a HCC. A CONACYT por las becas otorgadas a MIMM y KMDT.

Bibliografía.

1. Sánchez-García, M., et al. (2009). *Agricultura Técnica En México*, 35(1), 46–57.
2. O'connell, R.J., J.A. Bailey and D.V. Richmond (1985). *Physiological Plant Pathology*, 27(1), 75–98.
3. Martínez-anaya, C., et al. (2008). *Latinoam Microbiol* 50:119–131.
4. Kuramae-Izoaka, E. E. (1997). *UNIMAR*, 19(3), 683–689.
5. Rouvinen, J., et al. (1990). *Science*; 249(4967):380-6

